Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
(Direktor: Prof. Dr. G. Henneberg)
Abt. für Bakteriologie und Seuchenforschung
(Leiter: Prof. Dr. HANSJÜRGEN RAETTIG)

# Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von $T_3$-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von
MICHAEL HOFFMANN
aus Breslau

1965

8544

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK LEIDEN

Dekan: Prof. Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Raettig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R.E. Bader
3. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Nicht einzeln im Buchhandel! Überreicht vom Verfasser

Sonderdruck aus dem
**Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene,**
1 Orig. **198 S. 371-390** (1965)
Gustav Fischer Verlag · Stuttgart

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
(Direktor: Prof. Dr. G. Henneberg)
Abt. für Bakteriologie und Seuchenforschung
(Leiter: Prof. Dr. Hansjürgen Raettig)

# Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von $T_3$-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe

**Michael Hoffmann**

Mit 5 Abbildungen im Text

Eingegangen am 3. Februar 1965

Die Schleimhaut des Intestinaltraktes stellt für Viren kein unüberwindliches Hindernis dar und kann von diesen ohne Aktivitätsverlust innerhalb weniger Min. durchdrungen werden. So tritt z. B. der Phage des Bakterium megaterium nach Magenspülung bei durchschnittlich 71,8% weißer Mäuse in das Blut über (5), und bei Ratten vermag der Coliphage $T_1$ die Dünndarmschleimhaut von ungefähr 25% der Versuchstiere zu passieren (4). Bradley und Mitarb. (1) verabreichten Aktinophagen im Trinkwasser an Mäuse und stellten diese ebenfalls nach Min. im Blut fest. Raettig untersuchte die Resorptionsfähigkeit der Wand des Intestinaltraktes für den Coli B Phagen $T_3$ (13) und später für das für Mäuse enterophatogene Parapoliomyelitisvirus Col

SK (14). Übereinstimmend stellte er beide Virusarten bereits 15 Min. nach oraler Fütterung im Blut fest. Bei einer derartig kurzen Durchdringungszeit konnten spezifische Infektionsvorgänge in der Darmwand ausgeschlossen werden. Raettig bezeichnete diese Virämie im Gegensatz zur Infektionsvirämie als Resorptionsvirämie.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, habe ich das Verhalten von in den Intestinaltrakt appliziertem Virus an dem Modell des $T_3$ Phagen weiter untersucht, und bin insbesondere der Frage nach dem Ort und dem Mechanismus der Passage, sowie der Aufnahme durch die Organe nachgegangen.

## Material und Methoden

### Versuchstiere

Es wurden Mäuse aus der Zucht des Robert Koch-Institutes vom NMRI-Stamm mit einem Durchschnittsgewicht von 20 g verwendet. Insgesamt wurden in Haupt- und Nebenversuchen ca. 1500 Mäuse untersucht.

### Phage

Als Modellvirus diente der Coli B Phage $T_3$. Dieser wurde mit E. Coli B beimpft auf Agarplatten vermehrt, mit Leitungswasser abgespült und filtriert (Titer durchschnittlich $6 \times 10^9$ E./ml) bzw. in E. Coli B beimpfter und zur Schaumeindämmung mit einem Tropfen Sauton-Öl versetzter Bouillonkultur vermehrt und filtriert (Titer durchschnittlich $2 \times 10^{10}$ E./ml).

### Orale Fütterung

Die Phagensuspension wurde mit einer abgestumpften Metallschlundsonde oral und in den Ösophagus bzw. mit einer flexiblen PVC-Sonde in den Magen in einer Menge von 0,25 ml verabreicht. In einigen Fällen nahmen die Mäuse den Phagen von einem suspensionsgetränkten Tupfer auf oder tranken ihn aus einer Pipette.

### Messung des Phagen-Gehaltes im Blut

Der Phagengehalt des Blutes wurde folgendermaßen geprüft: Nach Reinigung des Schwanzendes mit Jodtinktur wurde die Spitze kupiert. Zwei kleine Blutstropfen (ca. 0,01 ml) wurden mit einer 1,0 ml Pipette, die vorher durch Einstellen in ein Röhrchen mit 0,1 ml einer 3,8%igen Natriumcitratlösung angefeuchtet worden war, abgesaugt. Der Inhalt der Pipette wird mit 0,2 ml einer 4stündigen Colibrühekultur vermischt und auf eine Petrischale mit Wasserblaudextroseagar (15) aufgetropft und verteilt.

Der Phagengehalt in den Organen wurde festgestellt, indem diese nach steriler Entnahme mit Sand und einem Milliliter NaCl zermörsert und mit 1 ml Colibrühekultur versetzt wurden, wovon 0,3 ml auf Platte übertragen wurden. Soweit nicht anders angegeben, wurde auf Phagengehalt pro Milliliter umgerechnet.

Bei einigen Lungenuntersuchungen wurde der Bronchialbaum mit einer scharfen Nadel vom übrigen Lungengewebe getrennt, indem die Trachea fixiert und entlang der Bronchien das Lungengewebe abgetragen wurde.

In den Fällen, in denen Phagen zusammen mit Darmsaft gefüttert wurde, habe ich die Suspension durch etwa 5 cm Dünndarm von 4–5 Mäusen gespült.

Zur Magenblockade füllte ich 2 ml dicken Mehlbrei in den Magen und den untersten Ösophagusabschnitt.

### Rektale Applikation

Es wurden, wenn nicht anders angegeben, 0,2 ml Phagensuspension durch eine möglichst knapp über den Anus eingeführte, stumpfe Metallsonde verabreicht. In einigen, gesondert untersuchten Fällen, wurde die Sonde tiefer eingeführt. Um das sofortige Wiederausstoßen der Phagen zu verhindern, wurde der Anus einige Sekunden zugehalten. Die Versuchstiere wurden außerdem in einem kurzen Rohr so fixiert, daß sie sich die Applikationsstelle nicht belecken konnten. Blut- und Organuntersuchung erfolgte wie nach oraler Fütterung. Der Phagengehalt des Speichels wurde ermittelt, indem ein steriler, vorn angespitzter Filtrier-

papierstreifen möglichst tief in das Maul des Tieres geschoben wurde, während die Speicheldrüse von außen massiert wurde. Die leicht benetzte Spitze des Papiers wurde alsdann in 0,5 ml Colibrühekultur gebracht und dort etwa 3–4 Min. belassen. Anschließend wurden 0,3 ml davon auf Platten aufgetragen.

Tracheale Applikation

Zur trachealen Applikation wurden die Mäuse, zur Verminderung des Flimmerschlages im Respirationstrakt, mit Äther narkotisiert. In Rückenlage wurden dann 0,2 ml Phagensuspension oral gefüttert und der Tropfen über die Nasenlöcher ausgezogen, wobei ein Teil der Phagen aspiriert wurde.

Zur parenteralen Applikation wurden 0,1 ml Phagensuspension i.v., i.m. oder s.c. injiziert.

## Ergebnisse

### Orale Fütterung

Um einen Überblick über die Zahl der Phagenteilchen, die nach oraler Gabe in Blut und Organen erscheinen, zu erhalten, fütterte ich den Phagen an 72 Versuchstiere und bestimmte seinen Titer fortlaufend im Blut nach 15, 30 und 60 Min. sowie anschließend in Leber und Milz. Die Spalte 1 in Tabelle 1 zeigt, daß nach 15 Min. 49 Tiere (ca. 66%) positiv waren und daß die Virämiequoten nach 30 und 60 Min. niedriger liegen. Die Virämie ist nach 15 Min. mit durchschnittlich 23 Phagen pro Blutprobe am höchsten und fällt innerhalb der ersten Std. auf durchschnittlich 6 Phagen ab. Etwa bei der Hälfte der Tiere ist der Phage nach 60 Min. in Leber und Milz feststellbar, wobei die Milz im Durchschnitt relativ zehnmal soviel Phagen aufweist wie die Leber.

Die diesen Durchschnittswerten zugrundeliegenden Einzelergebnisse weichen in einem beträchtlichen Schwankungsbereich voneinander ab. Einen Eindruck hiervon vermittelt die Tabelle 2, mit einer Aufstellung der Befunde von 43 Tieren. In Gegenüberstellung zu den relativen Organwerten in Tabelle 1 ist hier der absolute Phagengehalt der Organe angegeben. Die Nieren wurden bei diesen Tieren mituntersucht. Die in Tabelle 2 durch Einzelfächer unterteilten Gruppen fassen die Tiere zusammen, die in einem Versuchsgang (an

Tabelle 1

Zusammenstellung der durchschnittlichen Phagenwerte in Blut, Leber und Milz nach verschiedenen Arten der oralen Fütterung von 0,25 ml Phagensuspension (Titer $6 \times 10^8$ E./ml). Die Entnahme der Organe erfolgte nach 60 Min., außer nach Gallenvorfütterung.

| | Blut | | | | | | Leber | | Milz | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 15 min. | pos. Ges.-zahl | 30 min. | pos. Ges.-zahl | 60 min. | pos. Ges.-zahl | 60 min. | pos. Ges.-zahl | 60 min. | pos. Ges.-zahl |
| 1. orale Fütterung | 23 | 49/72 | 18 | 45/72 | 6 | 38/72 | 35 | 37/72 | 442 | 35/72 |
| 2. tiefe orale Fütterung | 10 | 10/50 | 3 | 10/50 | 2 | 6/50 | 6 | 15/50 | 156 | 12/50 |
| 3. Magenspülung | 6 | 7/30 | 3,0 | 5/30 | 0,1 | 3/30 | 1,2 | 5/30 | 26 | 7/30 |
| 4. Magenblockade | 8 | 20/22 | 54 | 21/22 | 12 | 18/22 | 21 | 12/22 | 455 | 20/22 |
| 5. Tupferfütterung | 12 | 30/36 | 3 | 24/36 | 1 | 20/36 | 2 | 8/36 | 26 | 21/26 |
| 6. oral nach Gallensaftfütterung | 30 | 40/50 | 28 | 39/50 | — | | 327 | 45/50 | 273 | 40/50 |
| 7. oral + Darmsaft | 350 | 26/26 | 71 | 26/26 | 26 | 21/26 | 102 | 19/26 | 2340 | 22/36 |

Tabelle 2
Phagenwerte für Blut und Organ (Absolutwerte) von 43 Mäusen nach oraler Fütterung von 0,25 ml Phagensuspension (Titer $6 \times 10^9$ E./ml)

| Versuchstier | Blut 15 min | Blut 30 min | Blut 60 min | Leber | Milz | Niere |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 9 | — | — | — | — |
| 2 | 150 | 135 | 44 | 160 | 110 | 4 |
| 3 | 198 | 201 | 57 | 40 | 530 | 2 |
| 4 | 880 | 480 | 320 | 2500 | 4000 | — |
| 5 | 1 | 25 | — | 2 | 2 | — |
| 6 | 40 | 40 | 10 | 7 | 17 | 30 |
| 7 | 2 | 1 | 9 | 215 | 22 | 90 |
| 8 | — | 10 | — | — | — | — |
| 9 | — | 4 | 1 | 4 | 13 | 6 |
| 10 | — | — | — | — | — | — |
| 11 | 10 | 4 | 1 | — | 1 | — |
| 12 | 1 | — | — | — | — | — |
| 13 | 39 | 156 | 15 | 88 | 120 | 2 |
| 14 | — | — | — | — | — | — |
| 15 | — | — | — | — | — | — |
| 16 | — | — | — | — | — | — |
| 17 | — | — | — | 1 | 1 | 17 |
| 18 | — | — | — | — | — | — |
| 19 | 35 | 22 | 12 | 17 | 30 | 1 |
| 20 | 1 | 23 | 4 | 100 | 120 | 40 |
| 21 | — | 2 | 5 | — | — | — |
| 22 | 6 | 11 | 2 | 25 | 47 | 13 |
| 23 | 90 | 68 | 22 | 110 | 230 | 37 |
| 24 | 1 | 2 | 9 | — | — | — |
| 25 | — | 2 | — | — | — | — |
| 26 | — | — | — | — | — | — |
| 27 | — | — | — | — | — | — |
| 28 | — | 1 | — | 3 | — | — |
| 29 | 10 | 1 | — | — | — | — |
| 30 | 23 | 41 | 2 | 1 | — | — |
| 31 | 1 | 5 | 1 | 4 | 2 | — |
| 32 | — | — | — | — | — | — |
| 33 | 4 | 1 | — | — | — | — |
| 34 | — | — | — | — | — | — |
| 35 | 3 | — | — | — | — | — |
| 36 | — | — | — | — | — | — |
| 37 | — | — | — | — | — | — |
| 38 | 5 | 4 | 2 | — | 2 | — |
| 39 | 1 | — | — | 4 | — | — |
| 40 | — | — | — | 1 | 3 | 1 |
| 41 | 54 | 50 | 15 | 400 | 220 | 8 |
| 42 | — | — | — | — | — | — |
| 43 | — | — | — | — | — | — |

einem Versuchstag) untersucht wurden. Damit soll gezeigt werden, daß sowohl die Einzeltiere, als auch die an verschiedenen Tagen untersuchten Gruppen in ihrer Reaktion auf den oral verabreichten Phagen um etwa zwei Zehnerpotenzen differieren können. Auch der im Durchschnitt nach 15 Min. er-

mittelte Höhepunkt der Virämie ist bei einigen Tieren verzögert. Es fällt außerdem auf, daß keine Korrelation zwischen Virämie und Phagengehalt der Organe festgestellt werden kann.

Bisher hielt man den Dünndarm für den Ort der Resorption von oral gefüttertem Virus. Demnach wäre anzunehmen, daß die Resorptionsquoten gleich bleiben oder eher noch steigen, wenn der Phage in derselben Menge direkt in den Magen, oder mit der Impfsonde tief in den Ösophagus verabreicht wird, andererseits aber abnehmen, wenn der Durchgang des Magens blockiert wird. Ich habe diese 3 Versuche durchgeführt und die mittleren Phagengehalte von Blut und Organen in Querspalte 2–4 der Tabelle 1 denen der von mir „flach oral" genannten Fütterung gegenübergestellt. Überraschenderweise sinkt schon bei der tiefen oralen Fütterung in den Ösophagus die Zahl der positiven Tiere bzw. der durchschnittliche Phagengehalt der Proben deutlich ab. Von 50 Versuchstieren sind nun nur noch 10 nach 15 Min. blutpositiv, also etwa 20% gegenüber 66% nach flach oraler Fütterung. Noch geringer ist die Resorption nach der Magenspülung. Beträgt der durchschnittliche Phagengehalt einer Blutprobe bei flach oraler Fütterung nach 30 Min. noch 18 Einheiten, so ist er bei tiefer oraler Fütterung schon auf 3 abgesunken und beträgt bei Verabreichung der Phagensuspension in den Magen noch 0,3 Einheiten. Vergleicht man die Organwerte, so findet man diesen Abfall besonders deutlich, denn der durchschnittliche Phagengehalt der Leber ist nach Magenspülung um 2 Zehnerpotenzen niedriger als nach flach oraler Applikation, der Phagengehalt der Milz um eine Zehnerpotenz geringer.

Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, daß die Phagen schon in höheren Intestinalabschnitten resorbiert werden. Dieser Verdacht wird noch verstärkt durch das Verhalten der Mäuse auf oral zugeführte Phagen, denen der Weg in den Magen zuvor durch Fütterung eines dicken Mehlbreies versperrt wurde. Hiernach treten nach 15 Min. schon bei 20 von 22 Tieren durchschnittlich 8 Phagen in der Blutprobe auf, wie dies die Spalte 4 in Tabelle 1 zeigt. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen fällt nun aber der Phagengehalt des Blutes nicht ab, sondern hat seinen Höhepunkt bei 30 Min. Durch die Füllung des Magens scheint sich also die im Magen oder in tieferen Intestinalabschnitten stattfindende Resorption zu verzögern. Auch für diesen Versuch sind die Einzelergebnisse in Tabelle 3 angegeben, denn an ihnen ist auffällig, daß der Phagengehalt des bei 15 Min. entnommenen Blutes in deutlich kleinerem Bereich schwankt als bei gleichzeitigen Abnahmen nach oraler Fütterung ohne Blockade. Es kann mit Sicherheit angenommen werden, daß zu diesem Zeitpunkt der Magen bei allen Tieren gleichmäßig blockiert war und damit auch konstantere Verhältnisse gegeben waren. Die Entnahme vor allem bei 30 Min., aber auch die bei 60 Min., zeigen demgegenüber in einigen Fällen wieder eine hohe Abweichung vom Durchschnittswert.

Nachdem die bisher gezeigten Ergebnisse, deren durchschnittlicher Virämieverlauf in Abbildung 2 und deren Virämiequoten in Abbildung 1 graphisch dargestellt sind, einen indirekten Hinweis darauf geben, daß die Phagen schon oberhalb des Magen-Darmtraktes in den Blutstrom übertreten, soll dies im folgenden direkt untersucht werden.

Wird an Stelle des Phagen ein Farbstoff oral verfüttert, so findet man eine erkennbare Färbung des Duodenums frühestens nach 10 Min. Wenn der Phage also nach oraler Fütterung früher im Blut auftritt, so darf man annehmen, daß er schon weiter oben resorbiert wurde, und zwar um so höher, je

Tabelle 3

Phagengehalt von Blut und Organen (Absolutwerte) bei 22 Mäusen nach oraler Fütterung von 0,25 ml Phagensuspension (Titer $6 \times 10^9$) und vorausgegangener Magenblockade.

| Versuchstier | Blut 15 min | Blut 30 min | Blut 60 min | Leber | Milz |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 2 | 7 | — | 1 |
| 2 | 3 | 2 | 8 | — | 3 |
| 3 | 7 | 2 | 2 | 12 | — |
| 4 | 4 | 250 | 3 | — | — |
| 5 | 3 | 2 | 2 | — | 1 |
| 6 | 5 | 65 | 2 | — | 1 |
| 7 | 8 | — | — | 6 | 22 |
| 8 | 4 | 210 | 2 | — | 12 |
| 9 | 45 | 170 | 120 | 660 | 400 |
| 10 | 14 | 5 | 47 | — | 2 |
| 11 | 8 | 1 | 9 | 6 | 1 |
| 12 | 20 | 420 | 8 | — | 17 |
| 13 | 3 | 3 | 3 | 6 | 5 |
| 14 | 8 | 8 | 5 | — | 2 |
| 15 | 2 | 4 | — | — | 2 |
| 16 | — | 2 | 1 | 36 | 40 |
| 17 | 10 | 2 | 7 | 6 | 220 |
| 18 | 8 | 4 | 100 | 24 | 5 |
| 19 | 2 | 3 | 2 | 120 | 4 |
| 20 | 6 | 5 | 24 | 12 | 18 |
| 21 | 3 | 5 | 6 | 18 | 18 |
| 22 | — | 18 | 1 | 30 | 10 |

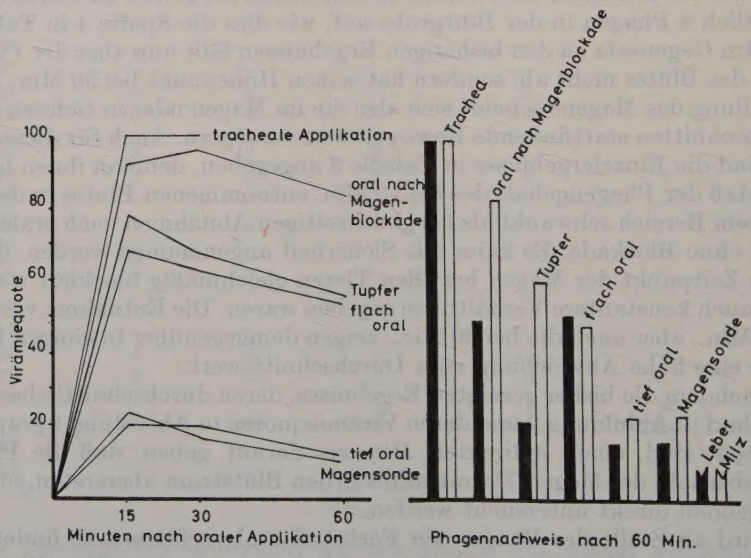


Abb. 1. Der zeitliche Ablauf der Virämiequoten nach verschiedenen oralen Fütterungsmethoden und die Speicherungsquoten von Leber und Milz nach 60 Min. in Prozent (Phagentiter: $6 \times 10^9$ bis $2 \times 10^{10}$ E./ml).

Tabelle 4

Phagengehalt von Blut und Organen (Absolutwerte) bei 36 Mäusen nach „Tupferapplikation" einer Phagensuspension (Titer $6 \times 10^9$ E./ml)

| Maus | 1–2 min | 5 min | Blut 15 min | 30 min | 60 min | Leber | Milz |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 4 | 4 | 7 | 2 | — | — |
| 2 | 4 | 28 | 4 | 5 | 2 | 2 | 1 |
| 3 | 4 | 4 | 7 | 3 | 2 | — | — |
| 4 | 12 | 4 | 5 | 2 | 2 | — | 1 |
| 5 | 3 | 33 | 45 | 5 | 1 | — | 1 |
| 6 | 11 | 4 | 10 | 5 | 5 | 3 | 14 |
| 7 | 15 | 15 | 71 | 3 | 3 | — | 1 |
| 8 | 8 | 2 | 3 | 6 | 3 | 5 | 1 |
| 9 | 60 | 27 | 54 | 8 | 5 | — | 1 |
| 10 | 15 | 7 | 43 | 11 | 3 | — | 1 |
| 11 | 11 | 7 | — | 3 | 2 | — | 1 |
| 12 | 17 | 17 | 9 | 3 | 5 | — | — |
| 13 | 2 | 21 | 4 | 1 | 1 | — | — |
| 14 | — | 1 | 2 | 1 | — | 4 | 2 |
| 15 | 1 | 3 | 5 | 1 | 2 | — | — |
| 16 | 5 | 1 | 4 | — | 2 | — | — |
| 17 | 3 | 5 | — | 1 | — | — | 1 |
| 18 | 4 | 6 | — | — | — | — | — |
| 19 | 4 | 3 | 3 | — | — | — | — |
| 20 | — | 3 | — | 1 | — | 1 | 1 |
| 21 | 4 | — | 2 | 1 | — | 1 | 10 |
| 22 | 3 | 3 | — | — | — | — | — |
| 23 | 1 | — | 1 | — | — | — | — |
| 24 | 1 | 49 | 1 | 4 | — | — | 1 |
| 25 | 21 | 21 | 3 | 3 | — | — | 1 |
| 26 | 39 | 3 | — | — | — | — | 1 |
| 27 | 1 | — | 3 | 2 | 1 | — | — |
| 28 | 7 | 28 | 4 | 35 | 2 | — | 1 |
| 29 | 5 | 42 | 7 | 2 | — | — | — |
| 30 | 3 | — | 2 | — | — | — | — |
| 31 | 4 | 2 | 1 | — | 1 | — | — |
| 32 | 7 | 1 | 1 | — | — | — | 1 |
| 33 | 2 | 19 | 2 | — | — | 2 | 2 |
| 34 | 3 | 5 | 3 | — | 1 | — | 20 |
| 35 | 1 | 1 | 49 | — | 1 | 5 | 1 |
| 36 | 2 | 3 | 17 | 14 | 2 | — | — |

früher er im Blut auftritt. Die frühesten Zeiten bestimmte ich in einem Versuch, bei dem die Mäuse auf einen phagengetränkten Wattetupfer bissen, wobei sie den Tupfer ausquetschten. Diese Methode hatte ich in Vorversuchen als Kontrolle zu den Sondenfütterungen angewandt, um zu prüfen, ob der Phage möglicherweise nur auf Grund von Verletzungen durch die Sonde in den Blutstrom gelangt. Obwohl hierbei die aufgenommene Phagenmenge etwas geringer ist als 0,25 ml, treten, wie Tabelle 4 zeigt, Phagen schon innerhalb von 1–2 Min. bei 34 von 36 Versuchstieren in das Blut über, auch bei den späteren Zeiten liegt die Virämiequote erstaunlich hoch; bei der 15 Min.-Entnahme etwa 83% gegenüber 66% nach oraler Sondenfütterung (Abb. 1). Im Durchschnitt enthalten die Blutproben zwischen 5 und 10 Min. am meisten Phagen, jedoch weniger als nach oraler Sondenfütterung (Tab. 1). Auch der Phagengehalt von Leber und Milz ist deutlich verringert. Die hohen Virämie-

quoten dieser Versuche zeigen, daß die Passage von Phagen in die Blutbahn nicht durch artifizielle, unphysioligische Verletzungen hervorgerufen wird.

Da die Möglichkeit bestand, daß Phagen aspiriert wurden, und da das frühe und regelmäßige Auftreten derselben im Blut nach dieser Fütterungs-

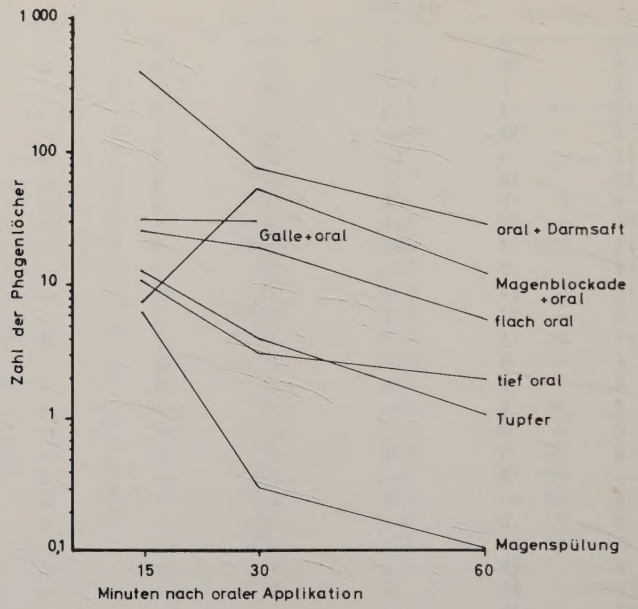


Abb. 2. Der zeitliche Ablauf des durchschnittlichen Phagengehaltes im Blut nach verschiedenen oralen Fütterungsmethoden im doppeltlogarithmischen Maßstab (Phagentiter: $6 \times 10^9$ bis $2 \times 10^{10}$ E./ml).

methode auf eine Passage durch die Respirationstraktschleimhaut zurückgeführt werden könnte, versuchte ich, die Phagen gezielt in die Trachea zu applizieren. Hierzu war es notwendig, den physiologischen Schluckakt zu stören (Rückenlage und Sonde im Maul), sowie den Flimmerschlag durch Narkose zu reduzieren bzw. auszuschalten. Auch ohne Narkose läßt sich eine tracheale Applikation durchführen; es kommt jedoch dabei leicht zu Bronchialspasmen, die den Erstickungstod der Versuchstiere herbeiführen.

## Tracheale Applikation

Über die Ergebnisse der trachealen Applikation wird in Teil 4 der Ergebnisse gesondert berichtet. In diesem Zusammenhang soll aber festgestellt werden, daß das Respirationstraktepithel in besonders hohem Maße auch Phagen durchlässig ist und daß bei dieser Applikationsart sämtliche Blutproben, sowie Leber und Milz innerhalb der ersten 30 Min. Phagen enthalten, und zwar durchschnittlich um eine Zehnerpotenz mehr als nach oraler Fütterung (Tab. 5 und Abb. 1). Der Höchstwert des Phagengehaltes im Blut liegt hierbei ebenfalls zwischen 5 und 15 Minuten.

In Tabelle 6 habe ich die Werte für kürzere Zeitabstände nach einer mitteltiefen oralen Fütterung bei 10 Tieren pro Blutwert den Blutbefunden einer

trachealen Applikation gegenübergestellt, wobei der Titer beide Male $2 \times 10^{10}$ E./ml betrug.

Der Höchstwert nach der mitteltiefen oralen Fütterung liegt bei 15 Min. Dies stellte ich auch bei anderen Versuchen mit oraler tieferer Phagenverabreichung für einen Titer von $6 \times 10^9$ Phagen/ml fest. Eine Verschiebung des Höchstwertes nach kürzeren Zeiten deutet auf eine tracheale Passagebeteiligung hin.

Tabelle 5

Mittlere Phagenwerte für Blut, Leber, Milz und Niere, sowie der Speicheldrüse nach

| | Zeitpunkt der Bestimmung nach Applikation | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2–3 min | 5 min | 15 min | 30 min |
| 1. flacher rektaler Applikation (0,2 ml Titer $2 \times 10^{10}$ E./ml) | | | | |
| Blut | 700 | 1000 | 500 | 65 |
| Leber | | 21 | 46 | 27 |
| Milz | 78 | 156 | 246 | 35 |
| Speicheldrüse | 11000 | 1150 | 900 | 300 |
| 2. intramuskulärer Applikation (0,1 ml Titer $2 \times 10^9$) | | | | |
| Blut | 94 | 325 | 800 | 485 |
| Leber | 456 | 2960 | 7400 | 5890 |
| Milz | 578 | 11330 | 26000 | 40300 |
| Niere | 660 | 640 | 600 | 70 |
| 3. trachealer Applikation (0,2 ml Titer $2 \times 10^{10}$ E./ml) | | | | |
| Blut | 145 | 202 | 170 | 62 |
| Leber | 3170 | 520 | 380 | 78 |
| Milz | 10010 | 724 | 610 | 130 |
| Speicheldrüse | 25000 | 5250 | 1388 | 1000 |
| Niere | 3000 | 130 | 114 | — |

So erklärt sich auch ein zunächst irritierendes Ergebnis nach den Trinkversuchen, die ich anstellte, um auch auf diesem Wege eine artifizielle Verletzung durch die Fütterung auszuschließen. Die Tiere saugten hierbei dieselbe Menge von Phagensuspension aus einer Pipette wie bei Sondenfütterung, jedoch lagen die Virämiequoten und die Zahl der in Blut und Organen nachweisbaren Phagen erheblich niedriger als nach oraler Sondenapplikation. Wenn die Maus die Phagensuspensierung trinkt, aspiriert sie bei normalem Schluckakt nicht.

Entsprechend ergab auch die Untersuchung der Lungen von 12 Versuchstieren, daß 5, 15, 30 und 60 Min. nach Aufnahme durch Trinken in keinem Falle mehr als 5 Phagen je Lunge gefunden wurden; 9 Tiere waren ganz negativ. Demgegenüber fand ich aber bei oraler Sondenapplikation 15 Min.

Tabelle 6

| Zeit | 2 min | 5 min | 15 min | 30 min |
|---|---|---|---|---|
| tracheal | 145 | 193 | 170 | 62 |
| oral | 12 | 8 | 22 | 4 |

nach der Fütterung bei 9 von 10 Tieren und nach 60 Min. bei 2 von 6 Tieren, komplett lysierte Platten, d.h. über $10^3$ Phagen, in der Lunge. Allerdings sind auch bei solchen Phagenmengen in der Lunge nicht in jedem Fall Phagen im Blut nachweisbar. Anscheinend muß hierzu eine Titerschwelle überschritten werden.

Bei jeweils 4 Tieren prüfte ich 15 und 60 Min. nach oraler Phagenfütterung die Phagenkonzentration im Dünndarm. Nach 15 Min. fand ich zwischen $10^4$–$10^5$ Phagen/ml, nach 60 Min. in keinem Falle über $10^3$ Phagen/ml bei einem Ausgangstiter von $2 \times 10^{10}$ E./ml.

Der Darmsaft übt innerhalb der ersten 30 Min. keinen inaktivierenden Einfluß auf die Phagen aus (4). Jedoch steigt die Resorptionsquote auf 100% und der durchschnittliche Phagengehalt des Blutes um 1–2 Zehnerpotenzen, wenn eine mit Darmsaft vermengte Phagensuspension an die Versuchstiere verfüttert wird. Trotz der hohen Virämiequoten sind nach 60 Min. aber nicht in allen Organen Phagen nachweisbar (Querspalte 7 in Tab. 1). Diese Erscheinung wurde bisher noch nicht weiter untersucht.

Nachdem von Raettig (13) festgestellt wurde, daß die Phagen langsamer aus dem Blutstrom verschwinden, wenn eine Stunde vor der Fütterung 0,5 ml Galle verabreicht werden, war es interessant, die dazugehörigen Organwerte zu erfahren. Das Ergebnis eines solchen Versuches an 50 Versuchstieren ist als Querspalte 6 in Tabelle 1 eingetragen. Bei leicht erhöhten Passagequoten fällt der mittlere Phagengehalt des Blutes innerhalb der ersten 30 Min. nur leicht ab, vor allem ist aber das Verhältnis des Phagengehaltes von Leber und Milz, welches ohne Gallenvorfütterung etwa 1:10 ist, zu Gunsten der Leber auf ca. 1,2:1 verschoben worden.

## Rektale Applikation

Mit der rektalen Applikation soll eine weitere Möglichkeit der enteralen Virusaufnahme untersucht werden. Diese bietet die Möglichkeit, den Magen mit seiner viruciden Wirksamkeit zu umgehen, so daß die unverminderte Phagenkonzentration für die Darmpassage zur Verfügung steht.

Nach der Verabreichung suchte ich den Phagen wie bisher in Blut, Leber und Milz, außerdem aber in der Speicheldrüse (gl. submandibularis) und im Speichel. Die Tabelle 7 zeigt den Phagengehalt in Blut, Leber und Milz von 10 Versuchstieren 15 Min. nach rektaler Gabe des Phagen und Werte von Speicheldrüse und Speichel, die bei anderen Tieren ebenfalls 15 Min. nach Applikation erhalten wurden. Diese Tabelle soll zeigen, daß die Zahl der nachweisbar die Schleimhaut durchdringenden Phagen gegenüber oraler Fütterung mehr als verzehnfacht ist; um diesen Faktor ist der durchschnittliche Gehalt der Blutproben erhöht. Der Phage wird in Leber, Milz und vor allem in der Speicheldrüse gesammelt und im Speichel ausgeschieden. Außerdem wird ein Eindruck davon gegeben, in welchem Ausmaß auch hier Schwankungen bei den Einzelproben auftreten.

Das Schwergewicht der Versuche mit rektaler Applikation des Phagen lag darauf, den Ablauf des Phagengehaltes von Blut, Speichel, Leber, Milz und Speicheldrüse innerhalb der ersten Stunde, insbesondere aber der ersten 30 Min., festzustellen. Hierzu wurden ca. 250 Tiere untersucht. Die Abbildung 3 zeigt die graphische Auswertung dieser Versuche. Der Blutphagenspiegel steigt schon innerhalb der ersten 3 Min. steil an, um nach 5 Min. mit durch-

schnittlich 1180 vermehrungsfähigen Einheiten ca. zwei Zehnerpotenzen höher zu liegen als nach oraler Fütterung, auf deren Höchstwerte er nach Ablauf einer Std. etwa absinkt. Die Organe Leber und Milz scheinen dagegen das erhöhte Phagenangebot nicht aufzunehmen, denn die Zahl der in ihnen nachweisbaren Phagen ist gegenüber der nach oraler Fütterung nicht erhöht. Ganz besonders hoch ist der Phagengehalt des Speichels. Die entnommene Speichelmenge berägt etwa 1/1000 ml. In dieser geringen Menge befinden sich 5 Min. nach rektaler Phagengabe durchschnittlich $2 \times 10^3$ Virusteilchen. Dies zeigt, in welchem hohen Maße Phagen im Speichel ausgeschieden werden können. Während der Abfall des Phagengehaltes im Speichel ähnlich verläuft wie der des Blutphagenspiegels, nehmen die in der Speicheldrüse selbst festgestellten Phagenwerte einen eigentümlich anderen Verlauf. Es entsteht der Eindruck, als sauge die Speicheldrüse die Phagen geradezu aus dem Blutstrom ab, denn sie sammelt innerhalb der ersten 3 Min. über $10^4$ Phagen/ml. Gleich darauf fällt aber der Phagengehalt ganz plötzlich innerhalb von 2 Min. um 90% ab, um im weiteren Verlauf dem Speichel- und dem Blutabfall angepaßt zu sein.

Tabelle 7

Anzahl der Phagen in Blut, Leber und Milz, sowie Speicheldrüse und Speichel 15 Min. nach rektaler Applikation von 0,2 ml Phagensuspension (Titer $2 \times 10^{10}$ E./ml).

| | Blut | Leber | Milz | Sp.drüse | Speichel |
|---|---|---|---|---|---|
| | 600 | 210 | 870 | 700 | 800 |
| | 220 | 51 | 240 | 20 | 1500 |
| | 600 | 12 | 78 | 1600 | 2500 |
| | 26 | 120 | 845 | 200 | 650 |
| | 110 | — | 13 | 700 | 1200 |
| | 750 | 9 | 26 | 600 | 2100 |
| | 310 | 6 | 20 | 290 | 150 |
| | 5 | 12 | 40 | 1200 | 3000 |
| | 850 | 60 | 220 | 10 | 800 |
| | 900 | 24 | 110 | 4000 | 2100 |
| Mittelwert | 438 | 50 | 246 | 920 | 1580 |

Die hohen Werte von Speichel und Speicheldrüse sind nicht dadurch hervorgerufen, daß sich die Tiere die Applikationsstelle beleckt hatten, denn hierzu waren sie durch Fixation nicht in der Lage. Um diesem Einwand gegen die Ergebnisse der Speicheldrüse aber auch positiv begegnen zu können,untersuchte ich die Speicheldrüsen von 10 Tieren 3 Min. nach oraler Fütterung und fand in keiner Drüse über 100 Phagen.

Die Zeit für die Darmwandpassage ist außerordentlich kurz. Bei 5 von 8 Mäusen fand ich den Phagen schon 10 Sek. nach der Applikation im Schwanzspitzenblut wieder, nach 40 Sek. waren 10 von 10 Tieren positiv. Auch umgekehrt ist die Darmwand für den Phagen durchlässig, denn bei 10 Tieren 10 Min. nach subcutaner Injektion aus dem Rektum ausmassierter Kot war in allen Fällen, teilweise sogar schon hoch, phagenpositiv. Auch durch den Bronchialbaum werden nach rektaler Applikation Phagen ausgeschieden, wobei der Höhepunkt ebenfalls nach 3–5 Min. erreicht ist. Nach Bronchial-

baum und Lungengewebe getrennt beträgt der absolute Gehalt 5 Min. nach Phagengabe:

| | |
|---|---|
| Bronchialbaum: | 500 Phagen |
| Lungengewebe: | 150 Phagen. |

Das Lungengewebe wurde allerdings bei der Präparation nicht frei von Bronchialsekreten erhalten.

Zur Resorption von rektal verabreichten Phagen ist eine Konzentration von über $10^5$ Phagen/ml erforderlich. Bei einem Applikationstiter von $10^6$ Phagen/ml sind noch ca. 50% der Versuchstiere positiv.

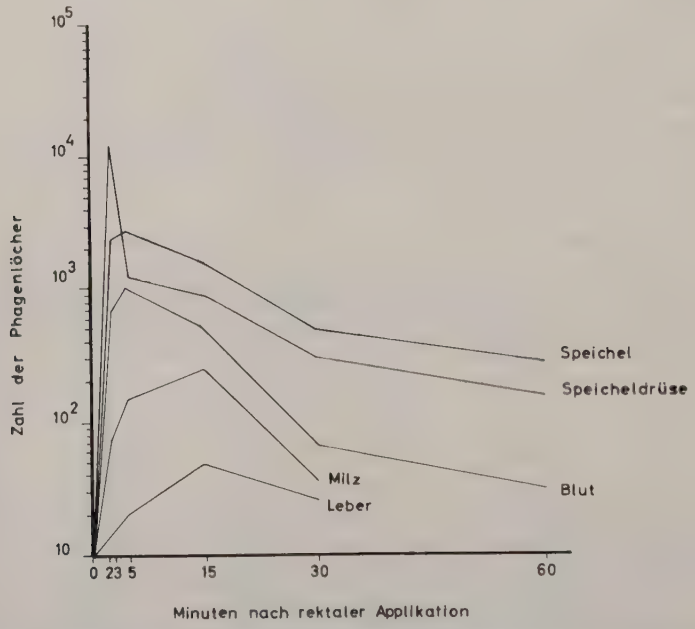


Abb. 3. Der zeitliche Ablauf des durchschnittlichen Phagengehaltes von Speichel, Speicheldrüse, Blut, Leber und Milz nach rektaler Phagengabe in doppeltlogarithmischem Maßstab (Phagentiter: $2 \times 10^{10}$ E./ml).

Die bisher gezeigten Resorptionsmengen sind Ergebnis einer flachen rektalen Phagenapplikation, d. h., die Impfsonde wurde nur knapp über den Anus in das Darmlumen eingeführt. Schiebt man diese dagegen weiter in den Mastdarm vor (tiefe rektale Applikation), so steigt dadurch, bei leicht erniedrigtem Phagengehalt des Blutes, die Aufnahme des Phagen in die Organe Leber und Milz um mehr als eine Zehnerpotenz an, während die Ausscheidung im Speichel reduziert ist (Tab. 8 und 9, Abb. 4). Angesichts der hohen, nach rektaler Verabreichung resorbierten Phagenmenge erschien es sinnvoll, das Verhalten der Mäuse nach dieser Applikationsart mit dem nach parenteraler Applikation zu vergleichen.

### Parenterale Applikation

Hierbei kam es mir einmal darauf an, die Aufnahme der Phagen in die Organe zu vergleichen, zum anderen die Ausscheidung durch den Speichel

gegenüberzustellen. Um den Blutphagenspiegel anzugleichen, wurde der Phagentiter für die intramuskuläre Applikation um eine Zehnerpotenz gesenkt. Aus Block 1 und 2 in Tabelle 5 geht hervor, daß die Phagen nach rektaler Gabe schneller eine hohe Konzentration im Blut erreichen und nach etwa 5 Min. mit 1000 Phagen als Mittelwert der Blutproben früher den Höchstwert erreichen, als nach intramukulärer Applikation, bei welcher der Höchstwert mit 800 Phagen pro Blutprobe erst nach 15 Min. erscheint. Auch in der Organspeicherung bestehen deutliche Unterschiede. Bei ungefähr gleicher Virämie wird der parenteral gegebene Phage in viel höherem Maße in Leber und Milz

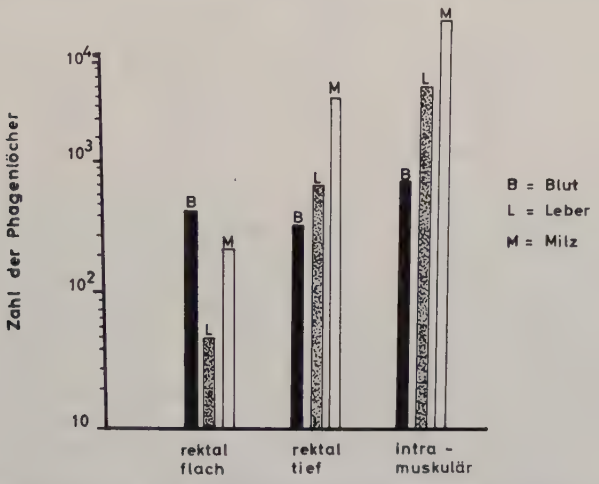


Abb. 4. Gegenüberstellung der Phagendurchschnittswerte von Blut, Leber und Milz 15 Min. nach flacher rektaler, tiefer rektaler und intramuskulärer Phagengabe, in doppelt logarithmischem Maßstab. (Titer wie in Tab. 8)

gespeichert, als der enteral resorbierte. Die Differenz des Phagengehaltes der Milz nach 30 Min. ist 35 : 40300 Phagen (Tab. 5). Ferner ist auffällig, daß nach intramuskulärer Gabe der Phagengehalt der Organe ansteigt, während er nach enteraler Verabreichung (besonders deutlich nach trachealer Applikation, ebenfalls Tab. 5) in diesem Zeitraum abfällt.

Die tiefe rektale Applikation nimmt eine Zwischenstellung ein, auch ihr folgt eine starke Anreicherung von Phagen in Leber und Milz (Tab. 8).

Tabelle 8

Gegenüberstellung der Phagendurchschnittswerte von Blut, Leber und Milz 15 Min. nach flacher und tiefer rektaler Applikation von 0,2 ml Phagensuspension mit einem Titer von $2 \times 10^{10}$ E./ml und i.m. Verabreichung von 0,1 ml Suspension in einem Titer von $2 \times 10/$ E./ml

| | Blut | Leber | Milz | Zahl der Mäuse |
|---|---|---|---|---|
| 1. flache rektale Applikation | 438 | 50 | 246 | 10 |
| 2. tiefe rektale Applikation | 388 | 710 | 4400 | 10 |
| 3. i.m. Applikation | 800 | 7400 | 26000 | 10 |

Zum Vergleich der im Speichel ausgeschiedenen Virusmenge gab ich gleiche Phagenmengen rektal flach und rektal tief, sowie intramuskulär und subcutan jeweils im Titer von $2 \times 10^{10}$ und $2 \times 10^{8}$ E./ml und prüfte nach 15 Min.

Tabelle 9

Gegenüberstellung der durchschnittlichen Phagenwerte von Blut und Speichel 15 Min. nach verschiedenen Applikationen von 0,1 ml Phagensuspension mit einem Titer von $1{,}5 \times 10^{10}$ und einem Titer von $1{,}5 \times 10^{8}$ Phagen/ml. Versuchstiere pro Durchschnittswert: 10 bzw. 12

| | | rektal flach | rektal tief | i.m. | s.c. |
|---|---|---|---|---|---|
| Titer $10^{8}$ | Blut | 6 | — | 111 | 40 |
| | Speichel | 64 | — | 15 | 262 |
| Titer $10^{10}$ | Blut | 490 | 400 | 2800 | 730 |
| | Speichel | 1200 | 470 | 850 | 1500 |

Blut und Speichel. Diese Gegenüberstellung zeigt Tabelle 9. Die tiefe rektale Applikation bewirkt ebenso wie die intramuskuläre eine geringere Ausscheidung der Phagen im Speichel, als die flache (ca. 1:3), während die Werte nach subcutaner Applikation denen nach flach rektaler Gabe relativ ähnlich sind.

In bezug auf die Sammlung des Phagen in der Speicheldrüse verhalten sich enterale und parenterale Applikation ebenfalls unterschiedlich, denn sowohl nach intravenöser, als auch nach intramuskulärer Injektion befindet sich das Virus in der gl. submandibularis stets in geringerer Konzentration als in Leber und Milz und zeigt insbesondere nicht die bei rektaler Applikation beobachtete Anreicherung in der Drüse innerhalb der ersten Min. mit dem sich daran anschließenden kurzfristigen Abfall.

### Tracheale Applikation

Die tracheale Applikation ist in ihrem Zusammenhang mit der oralen Fütterung bereits beschrieben worden. Sie soll nunmehr angesichts der Ergebnisse nach rektaler Applikation in bezug auf die Phagentiter der Organe der Tiere untersucht werden.

Den Verlauf des Phagengehaltes von Blut, Speicheldrüse, Leber, Milz und Niere zu verschiedenen Zeitpunkten nach trachealer Virusverabreichung zeigt Abbildung 5 sowie Tabelle 5. Nachdem bei oralgefütterten Mäusen in keinem von 10 Fällen in der Speicheldrüse $10^{3}$ Phagen/ml gefunden wurden (3 Min. nach der Fütterung), muß die enorm hohe, nach trachealer Applikation in diesem Organ nachgewiesene Zahl von $2{,}5 \times 10^{4}$ E./ml wie nach rektaler Applikation auf dem Blutweg zur Drüse gelangt sein. Ebenfalls wie nach rektaler Phagengabe fällt die Kurve des Phagengehaltes der Speicheldrüse, wie die Abbildung 5 zeigt, zwischen 3 und 5 Min. abrupt ab, während der Phagenspiegel des Blutes noch ansteigt. Leber und Milz machen aber, im Gegensatz zur rektalen Applikation, nach ebenfalls starker Sammlung der Phagen, diese Abfallbewegung des Phagengehaltes zwischen 3 und 5 Min. mit. Dies ist keine Leistung des RES, denn bei jeweils 5 Tieren zur Kontrolle angestellten Untersuchungen der Niere zeigen das Verhalten auch für dieses Organ (Tab. 5). Der Phagengehalt des Blutes liegt mit einem mittleren Höchstwert von

202 Phagen/Blutprobe bei 5 Min. deutlich niedriger, als nach rektaler Applikation, bei welcher dieser durchschnittlich 1000 Phagen/Blutprobe betrug. Auch hier können die Einzelproben um ca. 2 Zehnerpotenzen voneinander abweichen, was aber nicht andes zu erwarten ist, allein schon auf Grund der Tatsache, daß mit der trachealen Applikation ungleichgroße Virusmengen in den Respirationstrakt gelangen.

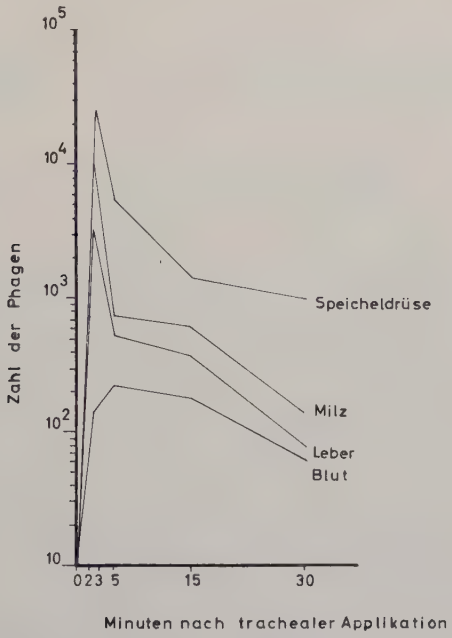


Abb. 5. Der zeitliche Ablauf des durchschnittlichen Phagengehaltes in Speicheldrüse, Milz, Leber und Blut nach trachealer Phagenapplikation in doppeltlogarithmischem Maßstab (Phagentiter: 2 × 10// E./ml.).

## Diskussion

Die vorliegenden Tierversuche zeigen, daß Phagen in unterschiedlichem Ausmaß die Schleimhäute des Intestinal- und des Respirationstraktes passieren. Diese Resorption ist eine Eigenschaft der Schleimhäute und nicht Resultat artifizieller Gewebsverletzungen durch die Sonde, wie die Resorptionsergebnisse nach Trinkversuchen (1), nach Tupferfütterung und nach trachealer Applikation, bei welcher die Luftröhre von der Kanüle nicht berührt wurde, zeigen.

Über die Schleimhaut des Respirationsorgans gelangen die Phagen besonders leicht in den Organismus. Darin ist die Ursache für die unterschiedlichen Resorptionsergebnisse nach tiefer und flacher oraler Phagengabe zu sehen. Je weiter die Applikationskanüle über den Kehlkopf hinaus in die Speiseröhre eingeführt wird, desto weniger Phagen treten in Blut und Organen in Erscheinung. Auch werden direkt in den Magen gegebene Phagen nur in sehr geringem Umfang resorbiert. Andererseits beträgt aber die Resorptionsquote nach

Tupferapplikation, bei welcher ein Teil der Phagensuspension aspiriert wird, nach 15 Min. 80% und steigt auf 100% bei trachealer Applikation an. Trinkt die Maus die Phagensuspension, dann entsprechen die Resorptionsergebnisse denen der Magenapplikation, Dies zeigt, daß in der Mundhöhle und in der Speiseröhre keine nennenswerte Resorption stattfinden kann, und daß die teilweise hohen Resorptionsmengen nach flach oraler Fütterung auf die Störung des Schluckautomatismus durch die Applikationssonde und damit auf ein „Verschlucken" der Phagensuspension in die Trachea zurückzuführen sind.

Bei der Durchquerung des Magens fällt der Titer der Phagensuspension um ca. 5 Zehnerpotenzen ab, so daß in tieferen Darmabschnitten nur noch eine geringe Menge Phagen für die Schleimhautpassage zur Verfügung steht. Infolgedessen sind die Resorptionsquoten gering.

Um den Magen zu umgehen, wurden die Phagen rektal verabreicht (Abb. 3). Hierbei gelangen diese bei allen Tieren in erheblichen Mengen in Blutstrom und Organe und werden im Speichel ausgeschieden. Eine Sonderstellung nimmt die Speicheldrüse ein, denn sie entnimmt dem Blutstrom innerhalb der ersten 2–3 Min. wesentlich mehr Phagen, als andere Gewebe und zwei Min. später sind nur noch 10% davon nachweisbar. Während dieses Abfalls steigt der Phagengehalt des Blutes, der anderen untersuchten Organe und selbst des Speichels an. Hierin besteht ein entscheidender Unterschied zu den Ergebnissen der parenteralen Phagenzufuhr, nach welcher die Speicheldrüse dieses Phänomen nicht zeigt, und zugleich ein Hinweis darauf, daß Phagen, die die Schleimhautbarriere passiert haben, in ihrer Oberflächenbeschaffenheit verändert wurden und der Organismus nunmehr anders auf sie reagiert. Ein näherer Vergleich der Applikationarten zeigt weitere Unterschiede. So werden die Phagen nach rektaler Applikation gegenüber intramuskulärer Gabe nur unwesentlich in den Organen Leber und Milz gespeichert, dafür aber verstärkt im Speichel ausgeschieden. Die Virämie erreicht nach rektaler Gabe ihren Höchstwert bereits nach 5 Min. und steigt andererseits nach intramuskulärer Injektion der Phagen träger an, um nach 15 Min. den Höchstwert zu erreichen.

Noch wesentlich deutlicher sind diese Unterschiede, wenn die Phagen über die Lungenschleimhaut in den Organismus gelangen (Tab. 5 und Abb. 4). Dabei filtriert nicht nur die Speicheldrüse große Phagenmengen aus dem Blutstrom ab, sondern auch Leber, Milz und Niere nehmen innerhalb der ersten 2–3 Min. über 100 mal mehr Phagen auf als nach rektaler und intramuskulärer Phagenverabreichung und inaktivieren diese zu 90% innerhalb von 2 Min. Diese Inaktivierung ist, wie die Nierenbefunde zeigen, wahrscheinlich eine allgemeine Zellfunktion und nicht auf die Organe des Retikuloendothelialen Systems beschränkt.

Die aspirierten Phagen werden also sehr schnell und zahlreich resorbiert, gelangen in das Blut und werden, anders als nach parenteraler Gabe, unverzüglich massiv in Zellen angereichert und zu 90% inaktiviert. Dadurch wird die Virämie niedrig gehalten und das Blut beziehungsweise die unspezifische humorale Abwehr geschont.

Die Schleimhaut bildet wahrscheinlich auf Grund ihrer Polyelektrolyte eine unspezifische Abwehrbarriere gegen Viren (21). Wird sie jedoch bei massivem Virenangriff durchbrochen, so präpariert sie diese in einer Weise, die den Organismus zu anderen Abwehrmaßnahmen befähigt.

Möglicherweise liegt dieser Mechanismus der Tatsache zu Grunde, daß der Antigeninhalation eine besonders gute Antikörperproduktion folgt (2, 7, 12, 17, 19, 20). Die Bildung der Antikörper ist eine zelluläre Funktion, zu welcher der Kontakt mit dem Antigen erforderlich ist. Dieser ist besonders intensiv für die durch die Lungenschleimhaut präparierten Viren, welche außerdem die unspezifischen humoralen Abwehrmechanismen weniger belasten.

Wieweit die Ergebnisse mit dem $T_3$-Phagen verallgemeinert werden dürffen und welche Bedeutung eine Präparation durch die Schleimhaut für eventuelle Immunisierungsmethoden mit aerosoliertem Impstoff und bei der physiologischen „stillen Feiung" hat, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

## Zusammenfassung

Untersucht wird die Durchlässigkeit der Schleimhaut des Intestinaltraktes und des Respirationstraktes für enteral einverleibtes Virus am Modell des $T_3$-Phagen bei insgesamt ca. 1500 weißen Mäusen.

1. 15 Min. nach oraler Fütterung einer hochkonzentrierten Phagensuspension kann das Virus bei 49 von 72 Versuchstieren (ca. 66%) im strömenden Blut nachgewiesen werden. Nach Ablauf einer Std. findet man es in 38 von 72 Blutproben.
2. Erfolgt die Verabreichung derselben Phagendosis in tieferen Ösophagusabschnitten, so verringert sich die Resorptionsquote auf ca. 20% und sinkt noch tiefer ab, wenn der Phage direkt in den Magen appliziert wird.
3. Die Sammlung des Phagen ist in der Milz durchschnittlich zehnmal so hoch wie in der Leber.
4. Die Differenz der Virämiequoten nach verschiedenen oralen Fütterungsmethoden erklärt sich durch die unterschiedliche Mitbeteiligung einer Resorption des Phagen im Respirationstrakt. Die Virämiequote steigt auf 90% an, wenn das Versuchstier den Phagen von einem suspensionsgetränkten Tupfer oral aufnimmt und gleichzeitig durch die Nase aspiriert und beträgt 100%, wenn das Virus direkt in die Trachea appliziert wird. Andererseits liegt die Virämiequote nach dem Trinken der Phagensuspension, wonach – im Gegensatz zu den genannten Applikationsarten – in den Lungen fast keine Phagen zu finden waren, knapp unter 20%.
5. Die Schwankungen der bei den einzelnen Tieren festgestellten Virämiequoten sind hoch.
6. Nach rektaler Applikation tritt der Phage in hoher Zahl bei allen Versuchstieren in den Blutstrom über. Die Virämie ist etwa ebenso hoch, wie nach intramuskulärer Applikation einer um eine Zehnerpotenz verringerten Phagendosis. Sie steigt jedoch rascher an und hat ihren Höhepunkt nach 5 Min., während nach intramuskulärer Gabe die Blutproben nach 15 Min. den höchsten Phagengehalt aufweisen. Deutliche Unterschiede bestehen in der Ausscheidung der Phagen im Speichel und in der Speicherung der Organe. Bei Verabreichung gleicher Phagenmengen reichert sich das Virus im Speichel nach rektaler Gabe wesentlich stärker an, als nach intramuskulärer Injektion, während die letztere umgekehrt eine wesentlich höhere Speicherung in Leber und Milz zur Folge hat.
7. Charakteristisch für die enterale Viruseinverleibung ist die bei rektaler Phagengabe beobachtete intensive Ansammlung des Virus innerhalb der ersten 2–3 Min. in der Speicheldrüse, mit einem darauffolgenden rapiden Abfall innerhalb von 2 Min. um ca. 90%. Diese Erscheinung findet man nicht bei parenteraler Phagengabe.
8. Nach Aspiration des Phagen in Narkose (tracheale Applikation) zeigt sich dieser Befund nicht nur in der Speicheldrüse, sondern auch in den Organen Milz, Leber und Niere. Der Phage scheint durch die Schleimhautpassage eine Präparation erfahren zu haben, die den Organismus in die Lage versetzt, die Viren unter Schonung humoraler Abwehrmechanismen innerhalb von 2 Min. zu 90% mit Hilfe zellulärer Abwehrmechanismen zu inaktivieren.

## Summary

Animal experiments on mucosa passage and absorption viremia of $T^3$ phages after oral, tracheal, and rectal administration

M. Hoffmann

The author studied the permeability of the mucosa of the intestinal tract and the respiratory tract for enterally ingested virus by the example of the $T^3$-phage in a total of approximately 1,500 white mice.

1. 15 minutes after oral administration of a highly concentrated phage suspension, the virus may be demonstrated in the flowing blood of 49 out of 72 experimental animals (approximately 66%). After one hour, the virus is found in 38 out of 72 blood samples.
2. If the same phage dose is administered in lower esophageal sections, the absorption rate decreases to approximately 20%; if the phage is applied to the stomach directly, it decreases even further.
3. In the spleen, the phage concentration is, on the average, 10 times as high as in the liver.
4. The difference in the viremia quota following the various oral feeding methods is explained by the difference in the part played by the phage absorption in the respiratory tract. The viremia quota rises to 90% if the experimental animal is administered the phage orally from a suspension-soaked swab and at the same time aspirates through the nose; viremia amounts to 100% if the virus is applied to the trachea directly. In contrast to the modes of application mentioned, almost no phages could be found in the lungs after drinking of the phage suspension. In this case, the viremia quota is slightly below 20%.
5. The fluctuations of the viremia quotas found in the individual animals are high.
6. After rectal application, a large quantity of phages enters the blood stream in all experimental animals. In this case, the viremia is approximately as high as after intramuscular administration of a phage dose which was reduced by an exponent of 10. However, it increases more rapidly and reaches its maximum after 5 minutes, while, after intramuscular administration, blood samples show the highest phage content after 15 minutes. There are marked differences in the excretion of the phage in the saliva and in the storage by organs. Upon administration of the same amount of phages, the virus concentration in the saliva is substantially higher after rectal application than after intramuscular injection, while vice versa, the latter results in considerably higher storage in liver and spleen.
7. The intensive concentration of the virus in the salivary gland within the first 2–3 minutes, followed by a rapid fall within 2 minutes by approximately 90%, as observed in the rectal administration of phages, is characteristic of enteral virus ingestion. This phenomenon does not occur in the parenteral administration of phages.
8. After aspiration of the phage during anaesthesia (tracheal administration), these results are not only found in the salivary gland, but also in the following organs: spleen, liver, and kidney. It seems that by the mucosa passage, the phage had undergone some procedure rendering the organism capable of inactivating the viruses within 5 minutes by means of cellular resistence mechanisms, while sparing humoral resistence mechanisms.



## Résumé

Expériences animales sur le passage muqueux et la virémie de résorption de phages $T_3$ après administration orale, trachéale et rectale

M. Hoffmann

On examine la perméabilité de la muqueuse du tractus intestinal et du tractus respiratoire pour des virus introduits par voie entérale sur le modèle du phage $T_3$ chez env. 1 500 souris blanches.

1. 15 minutes après ingestion orale d'une suspension de phages à forte concentration le virus peut être mis en évidence chez 49 sur 72 animaux d'expérience (env. 66%) dans le sang circulant. Au bout d'une heure on le retrouve dans 38 sur 72 échantillons de sang.
2. Si l'administration de la même dose de phage se fait dans des segments bas de l'oesophage, le taux de résorption diminue à env. 20% et tombe encore davantage si le phage est appliqué directement dans l'estomac.

3. L'accumulation des phages est en moyenne dans la rate dix fois plus importante que dans le foie.
4. La différence du taux de virémie après différentes méthodes d'administration orale s'explique par une participation différente de la résorption des phages dans le tractus respiratoire. Le taux de virémie monte à 90% si l'animal d'expérience ingère les phages par un tampon imbu de la suspension et s'il aspire en même temps par le nez et le taux est de 100%, si le virus est appliqué directement dans la trachée. D'autre part le taux de virémie est en-dessous de 20% après ingestion de la suspension dans du liquide, après quoi – contrairement aux autres méthodes d'ingestion – on n'a trouvé pratiquement aucun phage dans les poumons.
5. Les variations des taux de virémie trouvés chez les différents animaux sont importantes.
6. Après application rectale le phage passe en grand nombre dans le courant sanguin chez tous les animaux d'expérience. La virémie est pratiquement aussi élevée qu' après application intra-musculaire d'une dose de phages dix fois moins élevée. Elle augmente pourtant plus rapidement et atteint son maximum après cinq minutes, alors qu'après application intra-musculaire les échantillons de sang présentent leur maximum de phages après 15 minutes. Des différences nettes existent dans l'excrétion des phages dans la salive et dans l'accumulation dans les organes. Après administration d'une même quantité de phages le virus s'accumule dans la salive après application rectale d'une façon considérablement plus importante qu'après injection intra-musculaire, alors que cette dernière provoque inversément une accumulation considérablement plus importante dans le foie et la rate.
intra-musculaire, alors que cette derniére provoque inversément une accumulation
7. La caractéristique de l'ingestion entérale de virus est l'accumulation du virus observée après administration rectale au cours des 2–3 premières minutes dans la glande salivaire avec une chute subséquente rapide pendant les 2 minutes suivantes de env. 90%. Ce phénomène n'est pas observé après administration parentérale de phages.
8. Après aspiration du phage en narcose (application trachéale) ce phénomène ne se montre pas seulement dans la glande salivaire, mais aussi dans la rate, le foie et les reins. Le phage paraît avoir subi une préparation par le passage muqueux qui met l'organisme en mesure d'inactiver les virus en 2 minutes à 90% à l'aide des mécanismes de défense cellulaire et en ménageant en même temps les mécanismes de défense humorale.

## Resumen

Experimentos en animales sobre la permeabilidad mucosa y viremia de reabsorción de los fagos $T_3$ tras su administración por via oral, traqueal y rectal

M. Hoffmann

Se explora la permeabilidad de la mucosa del tracto intestinal y respiratorio para virus incorporados enteralmente, en el modelo del fagocito $T_3$. El estudio se realizó en 1.500 ratones blancos.

1. 15 minutos después de la administración oral de una suspensión de virus muy concentrada, en 49 de los 72 animales de experimentación (66%) se pudo demostrar la presencia de estos en la sangre circulante. Después de una hora se encuentran virus en 38 de las 72 pruebas de sangre.
2. Si se realiza la administración del virus, con las mismas dosis, en zonas bajas del esófago se reducen las cifras de reabsorción ae 20%. La cifra desciende aun mas si los fagos se administran directamente en el estómago.
3. La acumulación de fagos en el bazo es por termino medio 10 veces mayor a la del hígado.
4. La diferencia en las cifras de viremia tras distintos métodos de administración encuentra explicación en la colaboración diferente del tracto respiratorio en el proceso de reabsorción de los virus. Si los virus se administran al animal por via oral, a través de una torunda empapada en la suspensión, y si al mismo tiempo los aspira por la nariz, sube el coeficiente de viremia ya un 90%. Si, el virus se aplica directamente en la traquea la cifra supone un 100%. Por otra parte si se da a beber la suspensión de virus, aquí en contraposición a los demas procedimientos de administración no se encuentran fagos en el pulmón, el coeficiente de viremia supone escasamente un 20%.

5. Las oscilaciones de los coeficientes de viremia encontradas en animales aislados son altas.
6. En todos los animales de experimentación aparece un elevado numero de virus en el torrente circulatorio tras la administración rectal. La viremia es aproximadamente tan elevada como la que aparece tras la administracion intramuscular de una dosis reducida a la décima potencia. Su elevacion es mas rápida sin embargo, alcanzando el punto máximo a los cinco minutos. Tras la administracion intramuscular se alcanza, por el contrario, el máximo a los 15 minutos. En cuanto a la eliminacion de los virus por la saliva y a su depósito en los organos se ofrecen diferencias netas. Administrando dosis iguales de virus la saliva se enriqueze mucho mas si se utiliza la via rectal, que si se utiliza la inyección intra muscular. Esta última sin embargo lleva a un depósito de virus en bazo e hígado mucho mas elevado.
7. Un hecho caracteristico en la incorporación enteral de virus es su acumulaciôn elevada en las glándulas salivares en los 2–3 primeros minutos, tras la administración rectal. A continuación en un intérvalo de dos minutos aparece un descenso rópido de aproximadamente un 90%. Este hecho no aparece tras la administración parenteral.
8. Esta manifestación aparece no solo en las glándulas salivares sino también en bazo, hígado y riñones, tras la aspiración del virus en anestesia (aplicación traqueal). El fago parece adquirir a través de su paso por la mucosa una preparación que pone al organismo en situación de inactivarlos en un noventa por ciento, en el intervalo de dos minutos, a través de mecanismos de defensa humorales y con la ayuda de los procesos defensivos celulares.

## Schrifttum


1. Bradley, S., Kim, J. and Watson, D.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **113**, 686 (1963).
2. de Alessi, Giorn. Med. mil. **84**, 114 (1936).
3. Gretchmann und Brandis u.a.: Schweiz. Zeitschrift f. allgem. Pathologie u. Bakt. **20**, 322 (1957).
4. Hildebrand, G., Wolochow, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **109**, 183 (1962).
5. Keller, R. Enley, F.: Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. **98**, 577 (1958).
6. Komorow: Zit. nach: Handbuch der Histochemie B. II, 2. S. 317 Herausgegeben v. Graumann, W. und Neumann, K. H.
7. Matzumoto: Akta dermat. (Kyoto) **25**, 94 (1935).
8. Monnier, M.: Physiologie und Pathophysiolog. d. veget. Nervensystems, B. I, 175.
9. Mora, a. Young: J. of-Biolog. Chem. 273, 1870 (1962).
10. Mora, Young, Rizvi: J. of Biolog. Chem. 273 (1962).
11. Petzold, F.: Taschenbuch der Mediz.-Klin. Diagnostik, J. F. Bergmann Verl., München 1962. Seite 346.
12. Pfenninger: Ann. Pasteur (1921) 237.
13. Raettig, H.: Zbl. f. Bakt. I Orig. **191**, 97 (1963).
14. Raettig, H.: Zbl. f. Bakt. I Orig. **192**, 534 (1964).
15. Raettig, H. Hofmann, S.: Zbl. f. Bakt. I Orig. **161**, 121 (1954).
16. Rowley, D.: Bakteriol. Rewiew **24**, 106 (1960).
17. Sanarelli: Comd. rend. Soc. Biol. **91**, 1302 (1924).
18. Shaltin, Danton, Katschalski: Archiv of Biochem. a. Biophys. **99**, 494 (1962).
19. Smorodinzew et al.: Lancet 1936, 1381.
20. Smorodinzew et al.: Lancet 1936, 1383.
21. Voss: Zbl. f. Bakt. I Orig. **192**, 137 und **193**, 1 (1964).


Michael Hoffmann, 74 Tübingen, Doblerstraße 27

## Lebenslauf

Geboren in Breslau am 3. März 1939. 1945 Flucht nach Sigmaringen (Hohenzollern). Dort besuchte ich die Volksschule und das Humanistische Gymnasium. Abitur 1959 am Eberhard-Ludwigsgymnasium in Stuttgart. 1960 begann ich in Heidelberg das Studium der Medizin. Vorphysikum dort 1961. 1962 Physikum in Tübingen. Während der 4 folgenden Semester arbeitete ich an der vorgelegten Dissertation. Staatsexamen 1965 in Tübingen.